体外診断用医薬品　　2010 年 11 月作成(第 1 版)
承認番号 21400AMY00019000
Cat. No. 618915

この添付文書をよく読んでから使用してください。

パピローマウイルス核酸キット

HPV DNA「キアゲン」HCⅡ

重要な基本的注意事項
・本品はベセスダシステムにより ASC-US と判定された患者に適用されます。
・本品による陽性の判定結果は、子宮頸癌の原因ウイルスである中～高リスク型 HPV のいずれかに感染していることを示しています。

● 全般的な注意

1. 本品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的には使用できません。
2. 診断・治療効果の判定は、本法を含めて関連する他の検査や臨床症状に基づき医師が総合的に判断してください。
3. 添付文書以外の使用方法については保証をいたしません。
4. 使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用してください。

● 形状・構造等（キットの構成）

1. HPV プローブ試薬
   HPV RNA プローブ液
2. キャプチャープレート
   抗 DNA・RNA 複合体ウサギポリクローナル抗体固相化プレート
3. 検出試薬（1）
   アルカリフォスファターゼ標識抗 DNA・RNA 複合体マウスモノクローナル抗体
4. 検出試薬（2）
   Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethane-3,2′-(5′-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate 溶液
5. プローブ希釈液
6. ㊎ 検体抽出液
   （水酸化ナトリウム 7%）
7. 洗浄液原液
8. 色素液
9. 陰性コントロール
10. HPV 陽性コントロール

● 使用目的

子宮頸管部細胞中のヒト・パピローマウイルス（HPV）DNA の検出
なお、細胞診で、ベセスダシステムによって ASC-US*と診断された対象のコルポ診実施の判断の補助に用いる。

*ASC-US：LSIL［軽度扁平上皮内病変=HPV 感染又は軽度異形成］と診断するには足りないが、炎症や良性反応性変化を越えている扁平上皮系の細胞変化

● 測定原理

HPV DNA「キアゲン」HCⅡは、ハイブリッドキャプチャー法により検体中の中～高リスク型 HPV-DNA を検出するキットです。検体中の DNA を検体抽出液により抽出し、HPV プローブ試薬を用いてハイブリダイゼーションを行います。検体中に HPV-DNA が存在すると DNA/RNA ハイブリッドが形成されます。これをマイクロプレートに固相化した抗 DNA/RNA 抗体により捕捉し、更にアルカリフォスファターゼ標識抗 DNA/RNA 抗体を反応させ、得られた抗原抗体反応複合物と化学発光基質を反応させ、その化学発光を測定することにより検体中のヒト･パピローマウイルス（HPV）DNA を検出します。

1. 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 および 68 型の 13 種類の HPV が検出可能です。
2. RNA プローブとハイブリッドを形成した DNA/RNA 複合体を 96 穴のマイクロプレートを利用して免疫学的に測定するため客観的に結果を得られます。
3. 迅速かつ簡便で、多検体処理に適しています。

● 操作上の注意

1. 検体
   1）検体は子宮頸管部から採取した細胞を使用します。
   2）検体への異物の混入は絶対に避けてください。
   3）検体は、冷蔵または室温で 2 週間まで保存・輸送が可能です。検査室では 1 週間以内に測定を行う場合は、検体を 2～8℃で保存、すぐに使用しない場合は-20℃以下に保存し、3 ヵ月以内に使用してください。検体チューブ内の検体輸送液には、DNA 安定化のために、細菌の発生を抑制する保存剤が添加されていますが、組織や細胞の保持はできません。
   4）一度抽出反応を行なった検体およびコントロールは 4℃で一晩、又は-20℃で 3 ヵ月は保存可能です。又、凍結融解は 3 回までは影響ありません。この検体で再検査を実施する場合、「3. 測定操作法の 3）ハイブリダイゼーション」から反応を始めてください。
   5）操作中は必ずクリーンな手袋を着用してください。
   6）検体は別売の専用検体採取キットを使用し、採取キットの添付文書に従って採取をしてください。
   7）液状細胞診（LBC;ThinPrep または SurePath）検体を使用する場合、以下の前処理を行なった後に「3. 測定操作法の 3）ハイブリダイゼーション」から反応を始めてください。
   ① ThinPrep （PreservCyt） 検体の場合、別売の hc2 Sample Conversion Kit（5127-1220）を使用して、前処理を行なってください。
   ② SurePath 検体の場合、以下の手順で前処理を行なってください。
   - 細胞の分離操作後、精製水に懸濁した細胞 1.0 mL 中、標本作成に 0.2 mL 使用した残りの細胞懸濁液 0.8 mL に、新しい SurePath 溶液を 2.0 mL 加え、2.8 mL としたものを検体として使用します。
   - 検体の全量を遠沈チューブ（15 mL）に入れ、スイングローターで 800 x g、10 分間遠沈します。
   - 遠沈終了後、すぐに上清をデカンテーションで取り除きます。そのままキムタオル等の上で数回チューブを逆さにし、残液を完全に取り除きます。
   - 各遠沈チューブに検体輸送液（Specimen Transport Medium: STM）を 200μL 加えます。
   - 遠沈チューブをボルテックスミキサーで 15 秒間よく攪拌し、沈殿を懸濁します。沈殿が懸濁されない場合にはチューブの底から沈殿が剥がれるまで，さらに 5～30 秒間ボルテックスミキサーでよく攪拌します。
   - 各遠沈チューブに検体抽出試薬（検体抽出液＋色素液）を 100μL 加えます。
   - 遠沈チューブをボルテックスミキサーで 5 秒間よく混和します。
   - 遠沈チューブのキャップを確実に閉め、65℃のウォーターバスで 90 分間インキュベートします。
   - インキュベーション終了後、ハイブリダイゼーション反応を行います。

2. 妨害物質
   検体中の血液、子宮内洗浄液、抗カビ･クリームおよび避妊ゼリーの影響は認められませんでした。

3. 交差反応

次の各種細菌（10^7 菌体/mL）および各ウイルスの DNA 又は RNA（4.0 ng/mL）とは交差反応性を示しませんでした。

Acinetobacter anitratus、*Acinetobacter lwoffi*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides melaninogenicus*、*Candida albicans*、*Chlamydia trachomatis*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia coli(HB101)b*、*Escherichia coli*、*Fusobacterium nucleatum*、*Gardnerella vaginalis*、*Haemophilus ducreyi*、*Klebsiella pneumoniae*、*Lactobacillus acidophilus*、*Mobiluncus curtisii*、*Mobiluncus mulieris*、*Mycoplasma hyorhinis*、*Mycoplasma hominis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Neisseria lactamica*、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria sicca*、*Peptostreptococcus anaerobius*、*Proteus vulgaris*、*Serratia marcescens*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus faecalis*、*Staphylococcus pyogenes*、*Treponema pallidum*、*Trichomonas vaginalis*、*Ureaplasma urealyticum*、*Staphylococcus aureus (Cowen strain)*、Adenovirus 2、Cytomegalovirus、Epstein-Barr Virus、Herpes Simplex virus Ⅰ、Herpes Simplex virus Ⅱ、Human Immunodeficiency Virus (HIV)

又、2 群（A 群：本品の検出対象外の 5 種類の HPV、B 群：本品の検出対象の 13 種類の HPV；16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 および 68 型）の HPV−DNA（10.0 pg/mL）をそれぞれ測定したところ、検出対象の 13 種類の HPV は陽性を示しましたが、検出対象でない 5 種類の HPV 型は陰性を示し、交差反応性は認められませんでした。

4. 用法、用量を遵守してください。用法、用量を変更した場合、十分な感度、正確性が得られない場合があります。

● 用法・用量（操作方法）

1. 試薬の調製方法

1）HPV プローブ試薬、プローブ希釈液：プローブ液

HPV プローブ試薬のチューブ内の液を底に集めるために軽く遠心を行います。ついで、プローブ希釈液と HPV プローブ試薬（滅菌済みのチップを用いて採取してください）を 25：1 に混ぜ、ボルテックスミキサーにより 5 秒以上撹拌します。この溶液は、用時調製し、測定後の残液は捨ててください。

（参考）試薬必要量

テスト数	プローブ希釈液	HPV プローブ試薬
96	3.50 mL	140.0 μL
48	1.75 mL	70.0 μL
24	0.875 mL	35.0 μL
16	0.500 mL	20.0 μL
8	0.375 mL	15.0 μL

2）キャプチャープレート：そのまま使用します。

3）検出試薬（1）：そのまま使用します。

4）検出試薬（2）：そのまま使用します。

5）検体抽出液、色素液：検体抽出試薬

色素液を 5 滴、検体抽出液のバイアルに加え、よく振って混ぜ、検体抽出試薬とします。検体抽出試薬は、2〜8℃で 3 ヵ月間は安定です。色が薄くなっていたら色素液を更に 5 滴加えて使用してください。

6）洗浄液原液：洗浄液

洗浄液原液 100 mL を 2,900 mL の精製水を用いて 30 倍に希釈します。この試薬は用時調製してください。

7）陰性コントロール：そのまま使用します。

8）HPV 陽性コントロール：そのまま使用します。

2. 必要な器具・器材・試薬等

・ルミノメーター（DML2000）システム（別売品）
・ロータリーシェーカー（別売品）
・マイクロプレートヒーター（別売品）
・マイクロプレートウォッシャー（別売品）
・検体チューブ用ラック
・ウォーターバス（65℃）
・ボルテックスミキサー
・マイクロピペット（20〜200 μL および 200〜1,000 μL）
・可変連続分注器
・8 チャンネルピペット
・8 チャンネルピペット用試薬リザーバー
・タイマー
・ハイブリダイゼーション用マイクロプレート
・マイクロプレート用プラスチックカバー
・検体チューブ用スクリューキャップ
・滅菌済みマイクロピペット用チップ
・ディスポーザブルプラスチック手袋（パウダーフリー）
・キムワイプ、キムタオル

3. 測定操作法

1）準備

①予め定温になるようマイクロプレートヒーターの電源を入れます（使用の 60 分前）。

②測定前に、検体と構成試薬をすべて室温に戻します。

③マイクロプレート上のサンプルレイアウトを決定します。陰性コントロール（NC）と HPV 陽性コントロール（PC）は各三重測定を行なってください。

サンプルレイアウトの例

	1	2	3
A	NC	検体 3	検体 11
B	NC	検体 4	検体 12
C	NC	検体 5	検体 13
D	PC	検体 6	検体 14
E	PC	検体 7	・
F	PC	検体 8	・
G	検体 1	検体 9	・
H	検体 2	検体 10	・

2）検体の抽出

①検体抽出試薬を HPV 陽性コントロールおよび各検体にそれぞれ 500 μL ずつ、陰性コントロールには 1,000 μL を分注します。試薬添加後、各検体のチューブには新しいスクリューキャップを締めてください。分注の際は、クロスコンタミネーションの原因になりますので、チップの先がチューブに触れないように注意してください。

②ボルテックスミキサーで各チューブを 5 秒間よく撹拌し、すべてのチューブの液の色が紫色であることを確認した後、65℃のウォーターバスで 45 分間反応させます。

3）ハイブリダイゼーション

①ハイブリダイゼーション用マイクロプレートの各ウェルに、調製済みのプローブ液を 25 μL ずつ分注します。

②検体の抽出反応終了後、検体チューブをボルテックスミキサーで撹拌してよく混ぜ、各抽出反応液を 75 μL ずつマイクロプレートに加えます。

③マイクロプレートにプラスチックカバーをして、ロータリーシェーカーで 1,100 rpm で約 3 分間振とう撹拌します。
撹拌後、すべてのウェルの液の色が黄色に変わるのを確認してください。紫色から変化しない場合、そのウェルに更に 25μL のプローブ液を加え撹拌します。

④予め 65℃に加温されたマイクロプレートヒーターに入れ、60 分間反応させます。

4）ハイブリッドキャプチャー

①反応終了後、マイクロプレートのウェル内の反応液の全量（100μL）を 8 チャンネルピペット等を用いてキャプチャープレートのウェルに移します。

②キャプチャープレートにプラスチックカバーをし、ロータリーシェーカーを用いて 20～25℃で 1,100 rpm、60 分間振とうして反応させます。

③反応終了後、プラスチックカバーをとり、マイクロプレートを逆さにしてウェルの中の液を捨てます。そのままキムタオル等の上で逆さにして 2～3 回叩き、残液を完全に除きます。

5）検出反応

①検出試薬（1）を各ウェルに 75μL ずつ分注し、プラスチックカバーをして 20～25℃で 30 分間反応させます。

②反応後、キャプチャープレートを洗浄液で 6 回洗浄します。

③検出試薬（2）を各ウェルに 75μL ずつ分注し、プラスチックカバーをして 20～25℃で 15 分間反応させます。

④検出試薬（2）を分注して 15 分経過後、ルミノメーターを用いてウェル内の化学発光を測定します。

● 測定結果の判定法

1．判定法

1）測定成立の判定

測定結果が以下の 3 つの条件を満たすことを確認します。条件を満たさなかった場合、測定結果を無効とし、測定をやり直します。

①陰性コントロールの測定値が 250 RLU 未満であることを確認します。又、陰性コントロールの 3 点の RLU 値の CV 値を算出し、25%以下であることを確認します。
CV 値が 25%を越えた場合、平均から最も離れた値を除いた 2 点のデータの CV 値を求め、25%以下であることを確認します。

②HPV 陽性コントロールの 3 点の RLU 値の CV 値を算出し、20%以下であることを確認します。CV 値が 20%を越えた場合、平均から最も離れた値を除いた 2 点のデータの CV 値を求め、20%以下であることを確認します。

③（HPV 陽性コントロールの測定値）／（陰性コントロール測定値）が 2.0 以上であることを確認します。

2）カットオフ値の検出

HPV 陽性コントロールの測定値 3 点の平均値を求め、これをカットオフ値とします。

3 点の測定値の CV 値が 20%を越えている場合、平均から最も離れた値を除いた 2 点のデータの平均値を求め、これをカットオフ値とします。

3）判定法

以下の計算式によりインデックス値を算出します。

（インデックス値）＝（検体の測定値）／（カットオフ値）

インデックス値によって次の通り判定します。

（インデックス値）＜ 1.0　陰　性（－）

1.0 ≦（インデックス値）　陽　性（＋）

2．判定上の注意

1） 陰性の結果は HPV 感染の可能性を完全に否定するものではありません。HPV-DNA 量が検出感度以下の場合、陰性と判定されます。

2） 本品は中～高リスク型 HPV 感染の診断のみに使用してください。

3） カットオフ値に近い測定値を示した検体は、再検査を推奨します。

4） 診断・治療効果の判定は、本法を含めて関連する他の検査や臨床症状に基づき医師が総合的に判断してください。

● 性能

1．感度・正確性

陰性コントロール（0 pg/mL）は陰性を示し、陽性管理検体（4.5～5.5 pg/mL）は陽性を示します。

2．同時再現性

陰性コントロール（0 pg/mL）および陽性管理検体（4.5～5.5 pg/mL）をそれぞれ 3 回同時に試験するとき、陰性コントロールはすべて陰性を示し、陽性管理検体はすべて陽性を示します。

3．最小検出感度

本品の各 HPV-DNA の検出感度は次表のとおりで、カットオフ値を示す陽性コントロールは HPV16 型 DNA を 1.0 pg/mL 含みます。

HPV 型	検出感度（pg/mL）
16	0.94～1.29
18	0.88～1.29
31	0.91～1.15
33	1.26～1.45
35	0.95～1.31
39	1.16～1.71
45	0.99～1.35
51	0.70～0.88
52	1.21～1.58
56	0.58～0.67
58	0.73～0.94
59	1.00～1.21
68	1.03～1.39

4．臨床試験

米国において 18 歳以上の女性、約 46,000 人を対象に子宮頸部細胞診によるスクリーニング検査を実施し、細胞診で ASC-US と判定された患者 785 例については再来院してもらい、細胞診の再検査、本品による HPV 検査および組織診を実施しました。

1）細胞診で ASC-US と判定された患者の再来院時における本品と組織診の結果

ASC-US の 785 例について、本品と組織診を比較した結果、本品では 354 例（45.1%）が HPV 陽性と判定されました。一方、組織診では 69 例（8.8%）が CIN2 以上の高度病変と判定されました。

本品による子宮頸部高度病変の検出感度は 92.8%（64/69）でした。又、本品の NPV（Negative Predictive Value）は 98.8%（426/431）であり、本品陰性と判定された場合は子宮頸部に病変のない可能性が高いことが示されました。本品陰性で高度病変が見られたのは 431 例中 5 例（1.2%）でした。

このことから、細胞診で ASC-US と判定された女性において本品が陰性であれば、子宮頸部に CIN2 以上の高度病変を有するリスクは極めて低いことが明らかとなりました。

細胞診 ASC-US グループの本キットと組織診の判定結果

		CIN2 以上の高度病変の有無（組織診）		
		有	無	TOTAL
HPV DNA 「キアゲン」HCⅡ（HPV 検査）	＋	64	290	354
	－	5	426	431
	TOTAL	69	716	785

2）本品と細胞診再検の高度病変の検出性能
細胞診 ASC-US 症例の本品と細胞診再検による高度病変の検出性能を比較しました。
ASC-US 症例中、再来院して細胞診の再検査を受診した 766 例について、精密検査（コルポ診およびそれに続く組織生検）施行の判断を細胞診の再検により行なった場合および本キットにより行なった場合の CIN2 以上の高度病変保有に対する感度、PPV（Positive Predictive Value）および NPV（Negative Predictive Value）を比較しました。
その結果、感度は、精密検査の実施を細胞診再検で判断した場合は 72.1%（49 例）、本品による判断では 92.6%（63 例）でした。細胞診再検では検出できなかった 19 例の高度病変保有者のうち 16 例（84.2%）が本品による HPV 検査により検出可能でした。
NPV は、細胞診再検では 95.8%、本品では 98.8%と共に高値を示しましたが、本品で陰性の場合 CIN2 以上の高度病変保有率は 1.2%（5/424）と、細胞診再検で陰性の場合の 4.2%（19/454）に比べ、1/3 以下と更に低率でした。
このことから本品により精密検査実施の判断を行なった場合、細胞診再検による判断に比べ、高度病変検出症例数（感度）は大きく向上し、本品による HPV 検査は細胞診の再検よりもより効率的に CIN2 以上の病変保有リスクの有無を判断することが可能であることが明らかとなりました。

細胞診再検および本品の高度病変（CIN2 以上）の検出性能

	感度	特異性	PPV	NPV
細胞診の再検により、精密検査の実施を判断した場合	72.1%（49/68）	62.3%（435/698）	15.7%（49/312）	95.8%（435/454）
本品により、精密検査の実施を判断した場合	92.6%（63/68）	60.0%（419/698）	18.4%（63/342）	98.8%（419/424）

● 使用上又は取り扱い上の注意

1. 取り扱い上の注意
   1）検体は、HBV、HIV、HCV 等の感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。
   2）検査にあたっては、感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用してください。
   3）検体については、ゴミ、カビ、細菌類、洗剤等の混入は絶対に避けてください。
   4）洗浄液原液には 1.5%のアジ化ナトリウムが含まれていますので、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意
   1）本品は貯蔵方法に従って保存し、使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
   2）凍結した試薬は使用しないでください。
   3）試薬は必ず室温に戻してから使用してください。
   4）検体抽出液は水酸化ナトリウムを含みますので、特に皮膚に付着したり目に入らないように注意してください。
   5）キャプチャープレートおよび検出試薬（2）は、アルカリフォスファターゼの混入に十分注意してください。偽陽性の原因となります。（特に検出試薬（1）はアルカリフォスファターゼを含有する構成試薬です。又、細菌、唾液、髪の毛又は皮膚の油分にもアルカリフォスファターゼが含まれています。）
   6）検出試薬（2）は光に対する感受性が高いので使用直前に必要量を分取し、すぐに使用してください。又、元のボトルには戻さないでください。
   7）異なるロットとの組み合わせで使用しないでください。
   8）使い残りの試薬の混合は避けてください（汚染や試薬の劣化をきたすことがあります）。

3. 廃棄上の注意
   1）検体、検査に使用した器具類および廃液は、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 1,000 ppm、1 時間以上浸漬）、グルタールアルデヒド溶液（2%、1 時間以上浸漬）等での消毒又はオートクレーブ処理（121℃、20 分以上）を行なってください。
   2）洗浄液原液には 1.5%のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、爆発性の強い金属アジドを生成することがありますので、廃棄は大量の流水で行なってください。
   3）試薬、検査に使用した器具類および廃液を廃棄する場合は、廃棄物の処理および清掃に関する法律、水質汚濁防止法等に従って、廃棄してください。

● 貯蔵方法、有効期間

1. 貯蔵方法：2～8℃
2. 有効期間：1 年

● 包装

製品名	包装内容	包装単位
HPV DNA 「キアゲン」HCⅡ (96 回測定用)	HPV プローブ試薬	0.2 mL x 1 瓶
	キャプチャープレート	96 ウェル x 1 枚
	検出試薬（1）	12 mL x 1 瓶
	検出試薬（2）	12 mL x 1 瓶
	プローブ希釈液	5.0 mL x 1 瓶
	検体抽出液	50 mL x 1 瓶
	洗浄液原液	100 mL x 1 瓶
	色素液	0.35 mL x 1 瓶
	陰性コントロール	2.0 mL x 1 瓶
	HPV 陽性コントロール	1.0 mL x 1 瓶

● 主要文献

1）IARC (WHO) IARC Handbooks of Cancer Prevention. **Vol.10**, IARC Press, 2005.
2）今野 良、永井 堅、永井 宏、根津 幸穂、榎本 明美、鈴木 光明: 診断と治療, **93(9)** : 1575-1582, 2005.
3）石 和久、喜納 勝成、宇津野 栄、鈴木 正明、久保田 武美、猪狩 淳:医学と薬学, **39(4)** : 849-853, 1998.
4）久保田 武美、石 和久、鈴木 正明、宇津野 栄、猪狩 淳:感染症学雑誌, **73(3)** : 233-238, 1999.
5）Clavel C, Masure M, Bory JP et al.:British J.Cancer **80(9)** : 1306-1311, 1999.
6）Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM et al. : Lancet **354** : 20-25, 1999.

● 問い合わせ先

株式会社キアゲン
〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1 Forefront Tower II
Tel:03-6890-7300 E-mail:techservice-jp@qiagen.com

● 製造販売元

株式会社キアゲン
東京都中央区勝どき3-13-1 Forefront Tower II

QKK-PI618915-02